



TITLE:

# Design of Protein Immobilization and Elasticity of Polymer Hydrogels for Cell Culture( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Toda, Hiroyuki

---

CITATION:

Toda, Hiroyuki. Design of Protein Immobilization and Elasticity of Polymer Hydrogels for Cell Culture. 京都大学, 2016, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19743>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

京都大学	博士（工 学）	氏名	戸 田 裕 之
論文題目	Design of Protein Immobilization and Elasticity of Polymer Hydrogels for Cell Culture （細胞培養のためのタンパク質固定化と高分子ハイドロゲル弾性率のデザイン）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>本論文は、生理活性物質であるタンパク質と細胞足場としての高分子ハイドロゲルを組み合わせ、細胞培養のための機能性基材をデザインし、細胞の増殖分化に与える影響について調べ、その研究成果をまとめたものであり、2部7章からなっている。緒言では、細胞培養基材における材料および工学的見地の重要性について具体例を交えて概説するとともに、研究目的とその背景、および本論文の概説が述べられている。</p> <p>第1部では、機能性基材を作製し、2次元環境下で細胞挙動に与える影響について調べている。</p> <p>第1章は Notch シグナルリガンドの Jagged1 を、生物学特異的相互作用を利用して配向固定化した基材を作製し、配向性が HSC 分画の増殖に与える影響を検討した。配向固定化には、protein A と Immunoglobulin G 抗体の Fc フラグメントとの生物学特異的相互作用を利用した。すなわち、Jagged1 と Fc フラグメントとを融合させたタンパク質（Jagged1-Fc）を protein A 固定化ガラス基材表面と生物学特異的に反応させることで配向固定化した。ランダム固定化群と比較して、Jagged1 はより配向性をもって固定化されていることを示した。マウス骨髄由来血球未分化細胞群を培養した結果、ランダム固定化群、Notch シグナル阻害群と比較して、Jagged1 配向固定化基材上で造血幹細胞（HSC）分画の増殖は有意に高くなった。第2章では、同様の手法で Eph/ephrin シグナルリガンドの ephrinB2 を配向固定化した貯蔵弾性率の異なるポリアクリルアミド（PAAm）ハイドロゲルを作製し、間葉系幹細胞（MSC）の細胞形態と骨分化を評価した。得られた PAAm ハイドロゲル上で MSC を培養した結果、ephrinB2 を配向固定化することで細胞形態が変化した。さらに、貯蔵弾性率 3.6 kPa の PAAm ハイドロゲル上に ephrinB2 を配向固定化した基材では、ephrinB2 ランダム固定化基材と比較して、有意に骨分化マーカー Runx2 の発現量が増加した。これは、貯蔵弾性率と ephrinB2 の配向性が共働的に Runx2 の発現量をかえることを示している。第3章では、培養中に貯蔵弾性率を動的に変化できるリン酸エステル基含有 PAAm ハイドロゲルを調製した。得られたハイドロゲルは、アルカリホスファターゼ（ALP）添加によりリン酸エステル基が加水分解され、ハイドロゲルの貯蔵弾性率は減少した。ハイドロゲル上で MSC を培養したところ、ALP 添加による貯蔵弾性率の減少にともない細胞形態が変化した。さらに、ALP 添加による貯蔵弾性率の変化により Runx2 発現量が増加する条件も見られた。第4章では、シリコン基材表面にグラフト密度の異なる濃厚ポリマーブラシを形成させた。ポリエチレングリコールメタクリレート（PEGMA）を異なるグラフト密度で表面グラフト重合を行い、それらの表面へのタンパク質吸着と細胞接着を評価した。濃厚ポリマーブラシの作製には表面原子移動ラジカル重合法を用いた。さらに、真空紫外光照射によりグラフト密度を変化させた。その結果、表面グラフト密度に関係なく、タンパク質の非特異吸着および細胞接着が抑制されることがわかった。</p> <p>第2部では、機能化したハイドロゲルを用いた3次元培養システムを検討した。</p>			

京都大学	博士（工 学）	氏名	戸 田 裕 之
<p>第 5 章では、サンドイッチ培養下における酸素濃度や MSC の細胞形態と増殖について調べた。酸素濃度は通常の 2 次元培養と同じであった。コラーゲン固定化 PAAm ハイドロゲルによる培養では、細胞形態はハイドロゲルの硬さに影響されたが、コラーゲン未固定ハイドロゲルではそれらの影響はみられなかった。細胞増殖は、上部の PAAm ハイドロゲル貯蔵弾性率の増加とともに、また、下部の貯蔵弾性率の減少とともに減少した。蛍光顕微鏡観察から、細胞は上下の PAAm ハイドロゲルに接着していることを確認した。以上のことから、細胞は上下の PAAm ハイドロゲルを認識し、それらの貯蔵弾性率が細胞状態に影響を与えることがわかった。第 6 章では、ephrinB2 配向固定化 PAAm ハイドロゲルを用いたサンドイッチ培養を行い、MSC の骨分化を調べた。2 次元培養と同様に、貯蔵弾性率 3.6 kPa をもつ ephrinB2 配向固定化 PAAm ハイドロゲルを用いた場合、他の貯蔵弾性率および ephrinB2 未固定群と比較して Runx2 発現量は有意に増加した。第 7 章では、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）含有ゼラチンハイドロゲルをマトリゲル上に置き、徐放化 VEGF による血管内皮細胞 3 次元遊走パターンを評価した。VEGF 含有ゼラチンハイドロゲルを置く場所に依存して、マトリゲル中に異なる VEGF 濃度勾配が形成された。この VEGF 濃度勾配に依存してマトリゲル内と血管内皮細胞は遊走した。これらの結果より、マトリゲル内に形成された VEGF の濃度勾配により血管内皮細胞の 3 次元的遊走を制御できることがわかった。</p> <p>以上のことから、生理活性物質および細胞足場を組み合わせた機能性基材をデザインすることで、HSC の増殖や MSC の増殖分化を制御できることがわかった。これらの制御には、固定化タンパク質の配向性や基材の貯蔵弾性率に依存することがわかった。さらに、機能化したハイドロゲルを用いた 3 次元培養においても、固定化タンパク質の配向性や基材の貯蔵弾性率を制御することで、MSC の増殖分化を制御できることがわかった。</p>			

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、生理活性物質であるタンパク質と細胞足場としての高分子ハイドロゲルを組み合わせ、細胞培養のための機能性基材をデザインし、細胞の増殖分化に与える影響について検討したものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

タンパク質の吸着状態を制御し、種々の基材を作製した。得られた基材を用いて HSC 分画および MSC の 2 次元培養を行った結果、1) 生物学特異的相互作用を利用してシグナルリガンドを固定化することで配向性を制御できること、2) ガラス基材および PAAm ハイドロゲルにシグナルリガンドを配向固定化できること、3) Notch シグナルリガンドの Jagged1 を配向固定化したガラス基材上で HSC 分画を培養すると HSC 分画が有意に増殖すること、4) 貯蔵弾性率および ephrinB2 の配向性をかえた PAAm ハイドロゲル上で MSC を培養するとこれらが共働的に Runx2 の発現量をかえること、5) 貯蔵弾性率を動的に変化できるリン酸エステル基含有 PAAm ハイドロゲル上で MSC を培養することで、貯蔵弾性率の動的変化が Runx2 発現量に影響を与えること、6) グラフト密度の異なる PEGMA のポリマーブラシをもつシリコン基材表面は表面グラフト密度に関係なく細胞接着が抑制されることを明らかにした。

機能化したハイドロゲルを用いた 3 次元培養システムを検討した結果、7) MSC をサンドイッチ培養することで上下の PAAm ハイドロゲルの貯蔵弾性率および固定化コラーゲンが細胞形態と増殖に影響すること、8) ephrinB2 配向固定化 PAAm ハイドロゲルによりサンドイッチ培養をすることで、2 次元培養と同様に Runx2 発現量は有意に増加すること、9) VEGF 含有ゼラチンハイドロゲルをマトリゲル上に置くことで、ゼラチンハイドロゲルの場所に依存して形成された VEGF 濃度勾配により、血管内皮細胞はマトリゲル内を遊走することを明らかにした。

以上、本論文は、機能性培養基材を利用した細胞の増殖分化制御に関して重要な基礎的知見を与えるものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成28年2月19日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日： 2016年 3月23日以降